Beiträge zur Chemie der Hefe.

Von der
Königlich Technischen Hochschule zu München
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
technischen Wissenschaften (Doktor-
Ingenieurs) genehmigte Dissertation

vorgelegt von

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

Dipl.-Ing. Gustav Dreyer.

Referent: Professor Dr. Karl Lintner.
Korreferent: Professor Dr. Andreas Lipp.

Tag der mündlichen Prüfung: 8. März 1912.

Borna-Leipzig
Buchdruckerei Robert Noske
1912.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546317_0061

Herrn Toby Hazelnut

in Freundschaft gewidmet.

Nachstehende Arbeit wurde im gärungschemischen Institut der Kgl. Technischen Hochschule zu München ausgeführt.

Es sei mir an dieser Stelle gestattet,

Herrn Prof. **Dr. Karl Lintner,**

auf dessen Anregung und unter dessen Leitung diese Untersuchungen unternommen wurden, meinen Dank auszusprechen für das Interesse, das er mir hierbei entgegenbrachte, und die bereitwillige Unterstützung, die er mir jederzeit angedeihen ließ.

Geschichtliches über die Membran und die Kohlenhydrate der Hefe.

Der erste, der sich mit der chemischen Natur der Hefe beschäftigte, war Schloßberger.[1]) Er hatte durch Behandlung mit Kalilauge und Essigsäure eine Hefencellulose gewonnen, welche dieselbe prozentische Zusammensetzung besaß wie echte Cellulose.

Neuere eingehende Untersuchungen über die Natur der Hefenmembran stammen von Salkowski,[2]) welcher fand, daß Hefencellulose mit der gewöhnlichen Cellulose nichts gemein hat, da sie sich bereits beim andauernden Kochen in Wasser löst.

In späteren Untersuchungen[3]) schrieb derselbe Forscher der Hefe zwei verschiedene Cellulosearten zu, die er als Erythro- und Achroocellulose unterschied. Die Hefencellulose gewann er durch Kochen der Hefe mit dem zehnfachen Gewicht dreiprozentiger Kalilauge — dies geschah, um das Gummi und die Eiweißstoffe zu entfernen —, Abhebern der alkalischen Lösung und gründliches Auswaschen des Rückstandes mit Wasser.

Die als Erythrocellulose bezeichnete Substanz, welche sich durch ihre Braunfärbung mit Jod auszeichnet, geht beim Erhitzen der Membranen mit Wasser unter Druck oder am Rückflußkühler in Lösung und opalisiert dann ähnlich dem Glykogen. Auch der Umstand, daß dieser Körper bei der Hydrolyse mit Säuren quantitativ in Glukose zerfällt, weist auf eine Verwandtschaft mit Glykogen hin. Gleichwohl spricht sich Salkowski dahin aus, daß der in Frage stehende Körper zwar kein Glykogen

---

[1]) J. Liebigs Ann. 1844 Bd. 51 S. 193.
[2]) Arch. d. Anat. u. Physiol. 1890 S. 554.
[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1894 Bd. 27 S. 3325.

sei, wohl aber das, was andere Forscher irrtümlich für Glykogen gehalten hätten.

Achroocellulose nennt er den Bestandteil der Zellwand, der beim Erhitzen unter Druck als unlöslicher Rückstand verbleibt und sich mit Jod nicht färbt. Bei der Hydrolyse ergibt dieser Körper, neben Glukose in der Hauptmenge, nicht unerhebliche Mengen von Mannose. Er wäre demnach zu den Hemicellulosen zu rechnen.

Gleich Salkowski nehmen Meigen und Spreng[4]) zwei verschiedene Kohlenhydrate als Bestandteile der Hefenzellwand an: das sogen. Hefendextran, welches identisch zu sein scheint mit der Salkowskischen Erythrocellulose, und ein Mannodextran, das wohl der Salkowskischen Achroocellulose entspricht.

Zur Gewinnung ihrer Hefencellulose gingen sie von 1200 g frischer Hefe aus, welche sie sechs Monate lang mit 12 l $^1/_4$ %iger Kalilauge in der Kälte bei öfterem Wechseln derselben behandelten. Danach wurde die Substanz durch mehrfaches Dekantieren mit Wasser und Zentrifugieren gut gewaschen, mit Alkohol wiederholt gereinigt, mit Äther verrieben und schließlich abgesaugt. Die auf diesem Wege erhaltene Cellulose stellte ein grauweißes Pulver dar; die Ausbeute betrug 150 g = 12,5 % der angewandten frischen Hefe. Dieses Präparat war in Kupferoxydammoniak unlöslich. Mit Jodjodkaliumlösung versetzt, nahm es eine braune Färbung an, die beim Auswaschen mit Wasser wieder verschwand. Chlorzinklösung brachte keine Blaufärbung hervor. 20 g dieser Substanz erwärmten sie mit 3 %iger Schwefelsäure zehn Stunden lang auf dem Wasserbad, wobei 8,6 g unlöslicher Rückstand verblieben. Die Lösung wurde noch eine halbe Stunde gekocht und dann auf Zucker verarbeitet. Im Sirup konnten sie nur Dextrose, hingegen keine Mannose, Galaktose, Pentosen oder Methylpentosen nachweisen.

Zur Reindarstellung dieses Hefendextrans kochten sie das durch die oben beschriebene Behandlung mit $^1/_4$ %iger Kalilauge vom Gummi befreite Präparat mit 15 %iger Natronlauge 4 Stunden lang. Die ziemlich stark eingedampfte Lösung versetzten sie

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 1908 Bd. 55 S. 48.

mit der gleichen Menge Alkohol. Den weißen flockigen Niederschlag wuschen sie mit Alkohol und Äther, trockneten, lösten wieder in Wasser, neutralisierten genau mit Salzsäure, dialysierten bis zum Verschwinden der Chlorreaktion und fällten die eingedickte Lösung mit Alkohol. Dieses Präparat gab mit Fehlingscher Lösung keinen Niederschlag, von Bleiessig und Barythydrat wurde es gefällt. Die wäßrige Lösung opalisierte stark. Die spezifische Drehung der wäßrigen neutralen Lösung betrug + 113°. Dieser Körper soll identisch sein mit dem von Salkowski als Erythrocellulose bezeichneten.

Beim Kochen der Hefe mit Schwefelsäure erhielten sie als Rückstand ein bräunliches, stickstofffreies Pulver, welches bei der Hydrolyse Dextrose und Mannose zu gleichen Teilen ergab.

Liebermann und v. Bittó[5]) erhielten reine Hefencellulose, welche mit Chlorzinkjod positiv reagierte, durch Auslaugen der Hefe mit Säuren und Alkalien.

Chitin ist in der Hefenzellwand nicht vorhanden, wie C. van Wisselingh[6]) und C. Tanret[7]) durch ihre Untersuchungen erwiesen.

Was die anderen Kohlenhydrate der Hefe angeht, so ist vor allem zu erwähnen das Hefengummi, welches zweifellos auch als Bestandteil der Membran anzusehen ist.

Hier ist es Schützenberger,[8]) der sich zuerst mit diesem Körper beschäftigte. Er stellte aus Hefe ein Gummi dar, welches bei der Oxydation mit Salpetersäure ein Gemisch von Oxal- und Schleimsäure ergab. Demnach wäre auf ein Galaktan zu schließen, welches allerdings die anderen Forscher in der Folge vermißten.

Eingehend arbeiteten über das Hefengummi Nägeli und Loew.[9]) Allerdings scheint deren Produkt nicht frei gewesen zu sein von Verunreinigungen, wie Glykogen, was auch durch

---

[5]) Sitzungsber. d. naturw. Kl. d. ung. Akad. 1894.

[6]) Jahrb. wiss. Bot. 1898 Bd. 31 S. 619.

[7]) Bull. Soc. Chimique de Paris 1897 3. ser. Bd. 17 S. 921.

[8]) Bull. Soc. Chim. de Paris 1874 Bd. 21 S. 204 und Comptes rend. de l'Acad. 1874 Bd. 78 S. 493 u. 698.

[9]) Sitzungsber. d. bayer. Akad. d. Wiss. 1878 Bd. 8 S. 161; auch Liebigs Ann. Bd. 193 S. 322 und Journ. f. prakt. Chem. 1878 S. 403.

die Darstellungsmethode wahrscheinlich gemacht wird. Sie fällten den Körper aus den mit Bleiessig gereinigten wäßrigen Auskochungen von Hefe direkt mit heißem Alkohol. Der auf diesem Wege gewonnene Pilzschleim war Scheiblerschem Dextran ziemlich ähnlich, jedoch war seine spezifische Drehung eine bedeutend geringere. Sie fanden $[\alpha]_D = +78^0$ gegen 223^0 bei Scheiblers Dextran. Gleich diesem reduziert das „Hefendextran" Fehlingsche Lösung nicht, wird aber durch sie als käsiger, klumpiger Niederschlag gefällt. In heißem Wasser ist das Gummi löslich und wird durch Gerbsäure und Borax nicht ausgefällt und im Gegensatz zu gelöster Stärke bezw. Arabin auch von Bleiessig nur auf Alkalizugabe. Mit Jod färbt es sich braun. Durch Säuren wird es langsam zu Dextrose hydrolysiert. Bei der Oxydation mit Salpetersäure liefert es Zuckersäure, dann Oxalsäure, hingegen keine Schleimsäure.

Die Elementaranalyse entsprach der Formel $3(C_6H_{10}O_5)+2H_2O$. Für Zellhaut und Gummi geben diese beiden Forscher 37 % vom Trockengewicht der Hefe an.

Auch Salkowski[10]) beschäftigte sich mit dem in der Hefe vorkommenden Gummikörper. Einmal erhielt er ihn aus Hefe, die er der Selbstgärung in Chloroformwasser überließ, und hielt ihn für Laevulan. Später[11]) erhielt er ein Gummi durch $^1/_2$ stündiges Kochen von Hefe mit dem zehnfachen Gewicht 3 %iger Kalilauge und Fällen mit 15 Volumprozent Fehlingscher Lösung als Kupferverbindung. Aus der mit Salzsäure gelösten Verbindung schlug er das Gummi mit Alkohol nieder. Nach seinen Angaben macht es 6,9 % vom Trockengewicht der Hefe aus. Er schreibt ihm die Zusammensetzung $C_{12}H_{22}O_{11}$ zu. Die Drehung betrug $+90{,}1^0$. Pentosan soll die Substanz nicht enthalten.

Wegner[12]) beschreibt eine von ihm aus Hefe nach Scheiblers Verfahren dargestellte Substanz, die ähnliche Eigenschaften zeigte wie die oben angegebenen, als Dextran. Jedoch besaß sein

---

[10]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 1889 Bd. 13 S. 506.

[11]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1894 Bd. 27 S. 497.

[12]) Zeitschr. d. Vereins f. Rübenzuckerindustrie 1890 Bd. 40 S. 789.

Gummikörper ein spezifisches Drehungsvermögen von + 285,7°, also weit mehr als bei Salkowski angegeben ist.

Hessenlands[13]) Hefengummi lieferte bei der Hydrolyse viel mehr d-Mannose als Glukose. Zur Darstellung des Gummis kochte er Hefe mit wenig Kalk dreimal je 6 Stunden, entkalkte mit Ammonoxalat und schlug aus dem eingedickten und mit Salzsäure angesäuerten Filtrat das Gummi mittels Alkohol nieder. Zwischen Ober- und Unterhefe ergaben sich keine Verschiedenheiten.

Galaktose enthält nach ihm das Gummi nicht; wohl aber bis zu 2% der Trockensubstanz Pentosan. Die Drehung betrug + 283,7°. Der Kupferverbindung gibt er die Formel

$$(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot CuO \cdot H_2O,$$

der aus der alkalischen Gummilösung mit Bleiessig gefällten Bleiverbindung $(C_6H_{10}O_5)_2PbO \cdot H_2O$. Ferner stellte er eine Nitroverbindung des Gummis her, die gleich dem Nitroglycerin und der Nitrocellulose ein Ester der Salpetersäure darstellen soll, und eine Triacetylverbindung.

Nach Oshima[14]) enthält das Hefengummi neben viel Mannose auch eine Methylpentose, und zwar Fukose.

Meigen und Spreng[4]) stellten das Gummi auf dieselbe Weise dar wie Nägeli und Loew. Die spezifische Drehung betrug 58,5°. Bei der Säurehydrolyse fanden sie Mannose und Dextrose, wobei das erstere an Menge überwog, dagegen keine Galaktose. Ein nach Salkowski dargestelltes Gummi lieferte doppelt soviel Mannose wie Dextrose und zeigte eine spezifische Drehung von 89,6°.

Diese Verschiedenheiten in den Angaben über die chemische Natur des Hefengummis rühren wohl hauptsächlich von der verschiedenartigen Darstellung her. Daß der Gummikörper auch je nach der zur Verwendung kommenden Hefe in seinen Eigenschaften wechsle, ist wohl möglich. Wahrscheinlicher ist jedoch anzunehmen, daß derselbe Körper oder wenigstens einander sehr

---

[13]) Zeitschr. d. Vereins f. Rübenzuckerindustrie des ges. Deutschland 1892 Bd. 42 S. 671.

[14]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 1902 Bd. 36 S. 42.

ähnliche Körper, je nach den bei der Herstellung beobachteten Versuchsbedingungen in mehr oder weniger reinem Zustande erhalten werden und von eventuellen Verunreinigungen nur sehr schwer befreit werden können, da die fremden Beimengungen in ihren Eigenschaften dem Gummi selbst wohl sehr nahestehen. Fraglich ist es auch, ob das Gummi als solches in der lebenden Hefe schon präformiert ist, oder ob es vielmehr erst bei den zu seiner Darstellung angewandten Eingriffen aus einem größeren Komplex abgespalten wird.

Ein Körper, der sicher sehr oft zu den Verunreinigungen des Gummis zählt, ist das Glykogen. Es wurde zuerst von Errera[15]) in der Hefe aufgefunden und eingehend untersucht. Clautrian[16]) fand in der Bierhefe mehr als 31 % Glykogen auf Trockensubstanz berechnet.

Das Hefenglykogen soll sich vom tierischen unterscheiden durch die schwächere Opaleszens seiner Lösungen. Auch soll es sich mit Jod in gleicher Gabe viel dunkler und mehr rotviolett färben als das braunrot werdende tierische Glykogen. Die Jodfärbung des tierischen soll bereits bei Temperaturen von 58—60° C, die des Hefenglykogens erst beim Erwärmen auf 72—73° C verblassen.

Vergleichende Untersuchungen über tierisches und Hefenglykogen rühren auch von Harden und Young[17]) her. Diese beiden fanden für Hefenglykogen $[\alpha]_D = +193{,}3°$, für tierisches $[\alpha]_D = +191{,}1$ bis 191,2.

Geschichtliches über die Eiweißkörper der Hefe.

Nach Untersuchungen von Naegeli und Loew[18]) enthält die Hefe 45 % Albuminstoffe und 2 % Peptone.

Von dem 7,776 % ausmachenden Stickstoff der Hefe sollen nach den Angaben von Stutzer 5,519 % auf Proteine und 2,257 % auf Nucleine entfallen.

[15]) Comptes rend. de l'Ac. 1895 Bd. 101 S. 283; Bot. Ztg. 1886 Bd. 44 S. 200 u. 316; Ber. d Deutsch. bot. Ges. 1887 Bd. 5.

[16]) Mém. publ. par l'Ac. roy. de Belg. 1895.

[17]) Journ. Chem. Society 1902 Bd. 81 S. 1224.

[18]) Journ. f. prakt. Chemie 1878 Bd. 17 S. 403.

A. Wroblewski[19]) bearbeitete die Proteinstoffe des Buchnerschen Hefepreßsaftes. Er trennte die darin enthaltenen Eiweißkörper durch fraktionierte Koagulation bei 41°, 51°, 56°, 59°, 62° und 68°. Beim Stehenbleiben des Saftes schien durch ein im Saft enthaltenes proteolytisches Enzym der bei 41° koagulierende Eiweißkörper vor allen anderen verdaut zu werden. Die widerstandsfähigsten waren die bei 51°, 56° und 59° koagulierenden.

Durch fraktionierte Aussalzung mit Ammonsulfat schied er die Eiweißkörper in zwei Fraktionen. Beim Mischen von 3,8 Vol. des Saftes mit 6,2 Vol. gesättigter Ammonsulfatlösung fielen die über 60° koagulierenden Eiweißkörper nieder, die unter 60° koagulierenden blieben in Lösung. Beim Sättigen mit Ammonsulfat fielen diese aus, daneben auch kleine Mengen Proteosen. Bei der Dialyse des klaren Saftes fielen Globuline in voluminösen Flocken aus. Im Filtrat der Globuline erzeugten Säuren einen voluminösen Niederschlag.

Th. Bokorny[20]) tötete Hefe durch Formalinlösung ab und ließ sie 24 Stunden damit in Berührung. Die Lösung enthielt 2,5% Pepton auf Hefentrockensubstanz berechnet. Um vorhandene Albumine und Albumosen zu gewinnen, trocknete er die Hefe bei warmer Zimmerluft vollständig aus, zerrieb sie und laugte sie mit warmem Wasser 6 Stunden aus. 100 g trockene Preßhefe lieferte 3 g Albumine.

Über die Spaltungsprodukte des Hefeneiweißes arbeitete Kutscher.[21]) Er überließ Hefe der Selbstverdauung und wies im Endprodukt Guanin, Adenin, Tyrosin, Ammoniak, Histidin, Arginin, Lysin und einen noch undefinierten Körper von der Zusammensetzung $C_8H_6N_4O_4$ nach.

Quantitative Untersuchungen über die wichtigsten Spaltungsprodukte des Hefeneiweißes rühren von R. Schroeder[22]) her. Das Hefeneiweiß stellte er her nach einem Verfahren von H. Buchner und M. Gruber durch Behandlung von Hefe mit

[19]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 1898 Bd. 31 S. 3218.
[20]) Die Spiritusindustrie 1900 Bd. 18 S. 9 u. 33.
[21]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 1901 Bd. 32 S. 59.
[22]) Hofmeisters Beitr. zur chem. Physiol. u. Pathol. 1902 Bd. 2 S. 389.

Äther. Die Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure lieferte 6,08 % Ammoniakstickstoff, 29,7 % Basenstickstoff, durch Phosphorwolframsäure gefällt, und 70,3 % Stickstoff der Aminosäuren. Ein zweiter Versuch ergab 6,58 % Ammoniakstickstoff, 29,5 % Basenstickstoff und 70,5 % Aminosäurenstickstoff. Vom Gesamtstickstoff entfielen auf Arginin plus Histidin 11,03 %. Unter den Aminosäuren waren Leucin reichlich, Tyrosin und Phenylalanin spärlich vorhanden. Ein Teil des Schwefels schien in cystinähnlicher Bindung vorzuliegen. Zucker und Glykokoll konnte Schroeder unter den Spaltungsprodukten nicht finden.

Experimenteller Teil.

Die vorliegende Arbeit zerfällt in zwei, völlig voneinander getrennte Teile. Der erste beschäftigt sich ausschließlich mit der Darstellung und Untersuchung der Hefemembran. Im zweiten wird die Einwirkung von Ammoniak und verschiedenen Salzen auf Hefe abgehandelt und die hierbei erhältliche Eiweißlösung näher charakterisiert. Das Ausgangsmaterial für sämtliche Versuche war untergärige Bierpreßhefe. Die Anregung für diese im zweiten Teil beschriebenen Untersuchungen ging aus von Sedlmayrs[1]) Beiträgen zur Chemie der Hefe, einer Arbeit, die ebenfalls im hiesigen gärungschemischen Laboratorium ausgeführt worden war und die sich in der Hauptsache mit alkoholischen Auszügen aus Hefe, dem Fettgehalt und dem Lecithin der Hefe, daneben aber auch mit dem aus Hefe vermittels Ammonkarbonat extrahierbaren Eiweiß beschäftigt.

Erster Teil.

Über die Natur der Membran.

1. Vorversuche mit gespanntem Wasserdampf.

Von diesen Untersuchungen her war noch Material vorhanden — eine Hefe, welche Sedlmayr zuerst mit kaltem und dann mehrfach mit heißem Alkohol extrahiert hatte —, welches event. zur Darstellung von Hefenzellulose dienen sollte.

Mit diesem Produkt wurde nun fürs erste ein Vorversuch angestellt, und zwar in der Weise, daß das Material mit Wasser unter Druck wiederholt ausgekocht wurde. Man wollte sich davon überzeugen, ob durch diese Behandlung ein der Zellulose höherer Pflanzen ähnlicher unlöslicher Rückstand zu erhalten ist.

[1]) Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 1903 Bd. 26 S. 381—385.

Zu diesem Zwecke wurden 5 g dieser lufttrockenen Hefe mit 200 ccm Wasser unter 3,5—4 Atm. Druck erhitzt. Nach 8stündigem Erhitzen wurde die Flüssigkeit abgegossen.

Die Hefe hatte sich bei dieser Behandlung zu einem Kuchen verkleistert, der sich am Boden des Gefäßes abgesetzt hatte. Dieser wurde nach abermaligem Versetzen mit Wasser derselben Behandlung unterzogen, und die Auskochungen wurden in dieser Weise 3 Wochen lang fortgesetzt, so daß im ganzen 12 Auskochungen erhalten wurden.

Die ersten Auszüge waren hellgelbe klare Flüssigkeiten, welche deutlich die Biuret- und Millonsche Reaktion, jedoch nicht die Schwefelbleireaktion zeigten. Mit alkalischer Kupferlösung ließ sich verhältnismäßig viel Gummi fällen. Vom fünften Auszug an fielen die Eiweißreaktionen nur noch sehr schwach aus; die Lösungen waren jetzt wasserhell und zeigten nur schwache Opaleszenz. Mit Jodjodkaliumlösung färbten sie sich braun. Bei Zugabe von Alkohol oder Barytwasser wurde eine milchige Trübung erhalten.

Nach 12maligem, je 8stündigem Kochen hatte sich die gesamte Hefe bis auf einen minimalen Rest eines graubraunen Pulvers vollständig aufgelöst, das allem Anschein nach nur aus Huminsubstanzen bestand.

Hiermit waren die Angaben von Salkowski, daß sich die Hefenzellwand beim andauernden Erhitzen mit Wasser löst, bestätigt.

2. Versuche zur Gewinnung der Membran durch mechanische Eingriffe.

Bei einer so geringen Widerstandsfähigkeit der Hefenzellulose war man also, um zu einer möglichst unveränderten Membran zu gelangen, darauf angewiesen, schärfere chemische Eingriffe zur Trennung der Zellwand vom Inhalt nach Möglichkeit zu vermeiden.

Zu diesem Endzweck wurden verschiedene Wege beschritten. Und zwar wurden die jetzt folgenden Versuche an frischer untergäriger Bierpreßhefe vorgenommen. Am vorteilhaftesten schien

es zu sein, die Wände zu zerreißen oder zu sprengen und den Inhalt durch Auslaugen mit Wasser herauszuwaschen.

Ein solcher mechanischer Eingriff wurde zuerst versucht vermittels des Buchnerschen Verfahrens zur Darstellung von Hefepreßsaft. Der Versuch wurde in der Weise variiert, daß die Hefe mit dem gleichen Gewicht Quarzsand, jedoch ohne Zusatz von Kieselgur in der von Buchner angegebenen Weise verrieben wurde. Die zerrissenen und spezifisch leichteren Zellen sollten dann von dem schwereren Quarzsand durch Aufschlämmen in Wasser und Absitzenlassen des Quarzsandes von diesem befreit und mit Wasser ausgelaugt werden. Es zeigte sich hierbei jedoch, daß einmal die Zahl der unverletzt gebliebenen Zellen verhältnismäßig groß war; andererseits waren die beim Reiben entstandenen Quarzsplitter so außerordentlich fein, daß eine Trennung von diesen Splittern durch Abschlämmen der zerrissenen Zellen nicht möglich war. Ebenso wurde an der Luft getrocknete Hefe ohne Zusatz von Quarzsand verrieben. Indessen war auch hier die Zertrümmerung der Zellen zu unvollständig, um dieses Verfahren zur Gewinnung von Membranen anwenden zu können.

Nun wurde, angeregt durch Untersuchungen von Overton,[1]) der Versuch gemacht, mit Hilfe des osmotischen Druckes die Zellwände der Hefe zu sprengen. Overton war es gelungen, Algenzellen dadurch zum Platzen zu bringen, daß er sie in eine Glyzerinlösung von solcher Konzentration brachte, die gerade noch keine Plasmolyse hervorrief. Nachdem er die Glyzerinlösung durch Stehenlassen an der Luft langsam eingedickt hatte, tauchte er die Zellen plötzlich in reines Wasser, wobei die Zellwände durch den hohen osmotischen Druck augenblicklich gesprengt wurden, wenn die Zellen mit 50 % igem Glyzerin imbibiert waren.

Mit Hefe wurden nun analoge Versuche in der Weise unternommen, daß eine Probe mit reinem Glyzerin, eine andere mit 50 % igem und eine dritte stufenweise mit 10-, 20-, 30-, 50 % igem und schließlich mit reinem Glyzerin behandelt wurde. Die erste

[1]) E. Overton, Vierteljahrsschr. d. naturforsch. Ges. in Zürich 1895 S. 38.

und zweite Hefeprobe wurde 8 Tage lang mit der Glyzerinlösung in Berührung gelassen; die dritte wurde je 2 Tage in der jeweiligen Konzentration belassen. Unter keiner der genannten Bedingungen konnte jedoch Plasmolyse beobachtet werden.

Die Hefezellen zeigten unter dem Mikroskop in jedem der angegebenen Fälle und zu jeder Zeit ein anscheinend unverändertes Aussehen. Wurde nun die so behandelte Hefe durch Abnutschen von Glyzerin nach Möglichkeit befreit und in destilliertem Wasser aufgeschlämmt, so ergab sich selbst nach mehrtägigem Stehen in keinem Fall eine Veränderung. Die Membranen hatten sich für eine Sprengung durch den osmotischen Druck als zu widerstandsfähig erwiesen.

3. Versuche, den Zellinhalt durch Autodigestion zu lösen.

Nach diesen beiden vergeblichen Bemühungen wurde ein anderer Weg eingeschlagen, der sich in der Folge als brauchbar erwies. Jetzt wurde das in der Hefe vorhandene proteolytische Enzym, die sogen. Endotryptase, der Herstellung von reinen Zellhäuten dienstbar gemacht. Dieses Enzym gehört nach Salkowski und Buchner und Hahn zu den tryptischen, d. h. es baut die genuinen Eiweißkörper bis zu Monoaminosäuren ab. Nach Angaben von Buchner und Hahn[1]) wird die durch Endotryptase bewerkstelligte Proteolyse durch saure Reaktion begünstigt.

Ein Zusatz von 0,1—0,2% Alkalien wirkt dagegen hemmend. Das Optimum für einen Salzsäurezusatz soll bei 0,2% liegen. Bei einer solchen Säurezugabe finden Buchner und Hahn, daß im Hefepreßsaft nach 18stündiger Digestion 92,2% des ursprünglich vorhandenen koagulierbaren Eiweißes verdaut worden waren.

Noch günstiger soll ein Zusatz von Essigsäure in äquimolekularer Menge wirken. In diesem Falle wurden bei 18stündiger Digestion 95% des koagulierbaren Eiweißes gespalten.

[1]) Die Zymasegärung.

Es wurden deshalb zwei Hefeproben in 0,2%iger Salzsäure bezw. in 0,45%iger Essigsäure unter Zusatz von 5% Toluol — ein solcher soll nicht hemmend wirken — in gut verschlossenen Gefäßen zur Autodigestion angesetzt.

Beide Proben gerieten anfänglich in ziemlich starke Selbstgärung, die bekanntlich auf Kosten des Glykogens vor sich geht, und wurden deshalb bis zu deren Beendigung bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach ungefähr zwölf Stunden war die Selbstgärung beendet, und die Proben wurden bei 40° C während acht Tagen der Selbstverdauung überlassen. Nach Verlauf dieser Zeit zeigte sich bei der mikroskopischen Untersuchung durch Jodfärbung, daß die mit Salzsäure angesetzte Hefe noch ziemlich viel Eiweiß enthielt, während in der mit Essigsäure behandelten der protoplasmatische Inhalt bis auf einen ganz geringen Rest geschwunden war.

Im übrigen zeigten die Zellen ein anscheinend unverändertes Aussehen hinsichtlich ihrer Größe; sie waren keineswegs geschrumpft oder kleiner geworden. Außer dem Rest dieses Proteinkörpers enthielten die Zellen einige kleine stark glänzende Tröpfchen, die sich mit Jod nicht, mit Osmiumsäure jedoch deutlich braun färbten, also Fetttröpfchen waren. Die dunkelbraune Verdauungsflüssigkeit wurde nun vorsichtig abgegossen und der Rückstand durch häufiges Dekantieren mit Wasser gut ausgewaschen. Der Proteinrest wurde durch eintägiges Stehenlassen mit $\frac{n}{20}$ Natronlauge herausgelöst und die Lauge durch abermaliges häufiges Auswaschen mit Wasser vollständig entfernt. Zur Entfernung des Wassers und der Fetttröpfchen wurden nun die Membranen mit Alkohol und schließlich mit Äther extrahiert. Es verblieb ein fast weißes, vollkommen stickstofffreies Pulver, welches mit Wasser stark aufquoll und schleimig wurde.

In genau der gleichen Weise, wie sie hier beschrieben ist, wurden in essigsaurer Lösung zwei quantitative Versuche angesetzt. Und zwar wurden je 40 g Hefe mit 300 ccm 0,45%iger Essigsäure unter Zusatz von 5% Toluol in gut verschlossenem Kölbchen acht Tage lang bei 40° C der Autodigestion über-

lassen. Ausgewaschen wurde immer im Kölbchen durch Abhebern. Nach mehrfachem Auswaschen mit 96%igem und schließlich mit absolutem Alkohol wurde die Substanz durch Herausspülen mit Äther quantitativ in eine Extraktionshülse von Schleicher und Schüll gebracht und im Soxhletschen Apparat extrahiert und in der vorher tarierten Hülse gewogen.

Die zur Verwendung kommende Hefe hatte einen Wassergehalt von 73,20% und einen Stickstoffgehalt von 7,04% auf Trockensubstanz berechnet.

Bei diesen Versuchen ergab sich, daß 19% der Hefentrockensubstanz auf die völlig stickstofffreie Membran entfielen; den gleichen Prozentgehalt an Membranen zeigte auch eine andere in der gleichen Weise behandelte Hefe, während nach Naegeli und Loew Zellulose plus Gummi 37% und nach Meigen und Spreng die Zellulose etwa 46% der Trockensubstanz ausmachen soll.

Um größere Mengen dieser Membran zu gewinnen, wurden dann 10 kg Preßhefe mit 56 l 0,45%iger Essigsäure unter Zusatz von Toluol bei 40° C der Selbstverdauung überlassen und auf die oben beschriebene Art weiterbehandelt. Das am Schluß hierbei erhaltene Produkt stellte ein hellgraues, völlig stickstofffreies Pulver dar. Die Ausbeute betrug 200 g (7.4% der Trockensubstanz).

Im Verlauf der Darstellung dieses Produktes hatte sich nach der Behandlung mit Alkali eine Schicht schwach rötlich gefärbter Zellen abgesondert, die auf der Flüssigkeit schwammen. Diese Zellen enthielten sehr viel Glykogen, wie aus der Jodreaktion hervorging, während die am Boden sitzende reine weiße Schicht vollkommen glykogenfrei war. Die spezifisch leichtere Schicht wurde vorsichtig abgeschöpft und mit Äther ausgeschüttelt. Nach dem Verdampfen des Äthers blieb eine weiße, kristallinische Masse zurück, die sich nach dem Umkristallisieren aus Äther als reine Palmitinsäure erwies. F. P. 62°. K. P. unter 100 mm Druck 278°. Die Ausbeute betrug 1,5 g.

Die Herstellung der Zellhäute auf diesem Wege ist deshalb sehr mühselig und mit großen Verlusten verbunden, weil ein Filtrieren wegen der schleimigen Beschaffenheit der Substanz

ausgeschlossen ist. Man war deshalb auf Dekantieren angewiesen. Und die Zellen setzten sich natürlich um so langsamer zu Boden, je leerer sie waren.

Untersuchung der Membran.

Von der auf die oben angegebene Weise gewonnenen Substanz wurden 50 g nach dem Verfahren von Salkowski behandelt. Also mit 3%iger Kalilauge gekocht, ausgewaschen und mit Wasser 20 Stunden unter 2 - 2,5 Atm. Druck erhitzt.

Aus der hierbei durch halbstündiges Kochen mit Alkali gewonnenen dunkelgelben Lösung, die das Hefegummi enthalten mußte, wurde versucht, dieses nach den Angaben von Salkowski mittels Fehlingscher Lösung als Kupferverbindung zu fällen. Diesen Angaben gemäß soll die Verbindung nach Zugabe von 15 Volumprozent Fehlingscher Lösung beim Erhitzen ausfallen. Nach dieser Methode konnte jedoch weder in der Kälte noch beim Erhitzen eine Fällung erreicht werden. Dagegen wurde die Gummikupferverbindung aus der 3% Kaliumhydroxyd enthaltenden Lösung als graugrüner, klumpiger Niederschlag ausgefällt durch Zugabe von 45 Volumprozent Kupfersulfatlösung, wie sie zur Herstellung Fehlingscher Lösung verwendet wird.

Die so erhaltene Kupferverbindung wurde durch Dekantieren mit Wasser so lange gewaschen, bis das Waschwasser nahezu farblos war, schließlich aufs Filter gebracht, um das Wasser möglichst vollständig zu entfernen. Dann wurde die Verbindung in der Reibschale mit wenig Salzsäure in Lösung gebracht und aus dieser braungrün gefärbten Lösung das Gummi mit der sechsfachen Menge 96%igem Alkohol als großflockiger Niederschlag gefällt.

Nun wurde mit Alkohol mehrfach dekantiert und das Gummi schließlich auf dem Filter so lange mit Alkohol ausgewaschen, bis die grüne Farbe des Kupferchlorids geschwunden war. Das bräunlichgelb gefärbte Gummi wurde dann durch öfteres Ausfällen aus seiner mit Salzsäure angesäuerten wäßrigen Lösung mit Alkohol gereinigt und schließlich im Soxhletschen Apparat mit Äther extrahiert. Die fein pulverisierte Masse

wurde dann noch 24 Stunden lang auf 105° erhitzt, um die letzten Spuren von Alkohol zu vertreiben. Es resultierte schließlich ein rein weißes Pulver, welches sich in Wasser zu einer klaren Flüssigkeit kolloidal auflöste. Die Ausbeute an Gummi betrug 14,3 g.

Auf die gleiche Weise wie die Membranen wurden auch 380 g der Sedlmayrschen Hefe nach der Salkowskischen Methode behandelt. Hieraus wurden erhalten 10,6 g Gummi, 25 g der beim Kochen unter Druck löslichen Substanz und 21 g unlöslicher Rückstand.

Von dem unter Druck löslichen Körper, von welchem aus der Sedlmayerschen Hefe eine verhältnismäßig große Menge erhalten wurde, konnten aus den durch Autodigestion dargestellten Zellhäuten nur ganz minimale Mengen erhalten werden.

Untersuchung des Gummis.

Ein Teil dieses bei den beiden Versuchen erhaltenen Gummis wurde durch 8stündiges Erhitzen im kochenden Wasserbad mit 8%iger Schwefelsäure hydrolisiert. In dem im Verlauf der weiteren Verarbeitung erhaltenen Sirup wurde Mannose vermittels des Phenylhydrazons und p-Bromphenylhydrazons nachgewiesen. Das erhaltene Mannosephenylhydrazon schmolz bei langsamem Erhitzen zwischen 186°—188°, bei raschem Erhitzen von 195°—200°. Das Mannoseparabromphenylhydrazon bildete seidenglänzende Täfelchen, die in heißem Eisessig löslich waren und sich leicht daraus umkristallisieren ließen. Es schmolz bei 210°. Die Mannose wurde annähernd quantitativ bestimmt mit Hilfe des Hydrazons. Der Sirup enthielt annähernd ebensoviel Mannose wie Dextrose, deren Menge aus der Differenz der Trockensubstanz berechnet wurde.

Die Pentosanbestimmung zeigte, daß der Gehalt an Pentosen zu gering war, um eine nähere Identifizierung derselben vornehmen zu können. Es entfielen nur 0,35% des Gummis auf Pentosane.

Nach den Angaben von Tollens wurden 5 g Gummi mit 30 ccm Salpetersäure vom spez. Gewicht 1,15 auf dem Wasser-

bade zum Sirup abgedampft, der Rest der Salpetersäure durch Zusatz von Wasser und nochmaliges Eindampfen größtenteils verjagt, der Sirup in 20 ccm Wasser gelöst, in der Wärme mit Kaliumkarbonat neutralisiert und hierauf sowie nach dem nochmaligen Konzentrieren zur Sirupdicke einige Tropfen Essigsäure zugesetzt. Der entstandene dunkelbraune Kristallbrei wurde auf dem Tonteller abgesaugt und das saure zuckersaure Kalium aus wenig Wasser umkristallisiert. Durch nochmaliges Absaugen auf dem Tonteller und vorsichtiges Bestäuben mit Wasser wurde es von event. beigemengter Oxalsäure befreit, in Wasser gelöst und nach der Neutralisation mit Ammoniak mit Silbernitratlösung versetzt. Es fiel sofort ein milchiger Niederschlag aus, der nach einigem Umrühren und mehrstündigem Stehen abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet wurde.

Die Analyse ergab Ag = 50,68 %, während das zuckersaure Silber $C_6H_8Ag_2O_8$ theoretisch 50,87 % Ag enthält.

Desgleichen wurde nach den Tollensschen Angaben auf Schleimsäure geprüft. Zu diesem Zweck wurden 5 g Gummi mit 60 ccm Salpetersäure vom spez. Gewicht 1,15 in einem den Angaben entsprechenden Becherglas bis genau auf ein Drittel des Volumens eingedampft; in die völlig erkaltete gelbe Lösung wurden genau 0,5 g trockene reine Schleimsäure eingetragen und die Flüssigkeit mit 100 ccm Wasser verdünnt. Während vier Tagen wurde die Lösung öfter umgerührt und dann die Schleimsäure auf ein trockenes gewogenes Filter gebracht und nach vorsichtigem Auswaschen und Trocknen gewogen. Eine Gewichtszunahme hatte nach Abzug der 0,5 g nicht stattgefunden.

Galaktose ist demnach im Gummi nicht vorhanden.

Gewinnung und nähere Charakterisierung der glykogenähnlichen, durch Erhitzen der von Gummi befreiten Hefe mit Wasser unter Druck erhältlichen Substanz.

Nachdem nun die Membranen auf die oben angegebene Weise vom Gummi befreit worden waren, wurden sie bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion mit heißem Wasser aus-

gewaschen. Gummi konnte in den Waschwässern nach kurzer Zeit nicht mehr nachgewiesen werden. Ebensowenig wurde durch das heiße Wasser irgendein anderer mit Alkohol fällbarer Körper herausgelöst.

Die so gereinigte Masse wurde nun im Dampftopf mit viel Wasser 20 Stunden lang unter 2—2,5 Atm. Druck erhitzt.

Es sei hier nochmals hervorgehoben, daß aus den leeren Zellhäuten nur äußerst geringe Mengen des im folgenden näher beschriebenen Körpers erhalten wurden, und daß die genaueren Untersuchungen deshalb an einem Produkt vorgenommen werden mußten, welches, wie schon oben erwähnt, auf dem gleichen Weg aus der Sedlmayrschen Hefe gewonnen worden war.

Nach 20stündigem Erhitzen hatte sich ein unlöslicher hellbrauner Rückstand als gallertiger Klumpen zu Boden gesetzt. Die überstehende Flüssigkeit opalisierte stark. Sie wurde zuerst durch Eindampfen im Vakuum konzentriert und dann in einer Schale auf dem Wasserbade eingedampft. Es schied sich dabei die gelöste Substanz nicht, wie Salkowski angibt, in gallertartiger Form aus; die Flüssigkeit wurde nur immer dickflüssiger und schließlich schleimig. Die Farbe dieses klaren Schleimes war hellbraun. Eine davon entnommene Probe wurde vollständig zur Trockene verdampft; der so erhaltene Körper war vollkommen farblos, durchsichtig und glasig. Aus der schleimigen Lösung wurde die Substanz mit 96 %igem Alkohol als weißer, großflockiger Niederschlag gefällt, der sich beim Umrühren zu einer äußerst zähen Masse zusammenballte und bei längerem Durchkneten mit Alkohol sandig wurde. Durch mehrfaches Lösen in wenig Wasser und Fällen mit Alkohol wurde die Substanz gereinigt, mit Äther extrahiert, getrocknet und fein zerrieben. Um die letzten, hartnäckig zurückgehaltenen Spuren von Alkohol zu entfernen, wurde dieser Körper in gleicher Weise wie das Gummi ebenfalls 24 Stunden lang auf 105° erhitzt.

Es resultierte ein vollkommen stickstofffreies, fast rein weißes Pulver, daß nur einen ganz schwachen Stich ins Gelbliche zeigte.

Dieses Produkt zerfloß mit wenig Wasser zu einem hellbraunen Schleim. Mit mehr Wasser löste es sich nach einiger Zeit zu einer stark opalisierenden, schwach milchig getrübten

Flüssigkeit auf. Mit Jodjodkaliumlösung färbte sich diese Lösung tief braun. Es wurde der Versuch gemacht, die wäßrige Lösung zu polarisieren; doch war dies der Opaleszenz wegen nicht möglich. Es wurde deshalb in der gleichen Weise, wie dies bei der Polarisation der Stärke geschieht, eine salzsaure Lösung der Substanz hergestellt. 2,5 g Substanz wurden mit 10 ccm Wasser, dann mit 10 ccm konzentrierter Salzsäure bis zur klaren Lösung verrührt und die Flüssigkeit mit Salzsäure vom spez. Gewicht 1,25 zu 100 ccm aufgefüllt. In dieser salzsauren Lösung zeigte die Substanz die spezifische Drehung $[\alpha]_D = +194{,}6°$.

Die Elementaranalyse ergab für C = 44,37 %
für H = 6,34 %.

Für einen Körper von der Zusammensetzung $C_6H_{10}O_5$ würden die Werte für C und H 44,4 % bezw. 6,17 % betragen.

Aus ihrer wäßrigen Lösung konnte die Substanz durch Bleiessig allein nicht, wohl aber durch ammoniakalischen Bleiessig gefällt werden. In Alkalien und in Säuren löste sie sich auf. Aus der salzsauren Lösung wurde sie bei Zugabe von Phosphorwolframsäure als weißer, käsiger Niederschlag gefällt.

Ein Teil der Substanz wurde mit 8 %iger Schwefelsäure 10 Stunden lang im siedenden Wasserbad hydrolysiert und die entstandene Lösung auf Zucker verarbeitet. In dem erhaltenen Sirup konnte nur Glukose nachgewiesen werden vermittels des Osazons, hingegen keine Mannose. Pentosen waren ebenfalls nicht vorhanden, da sowohl die ursprüngliche Substanz als auch der Sirup keine Furfurolreaktion gaben. Bei der Oxydation mit Salpetersäure wurde nur Zuckersäure, dagegen keine Schleimsäure erhalten.

Die Substanz zerfällt demnach bei der Hydrolyse quantitativ in Glukose.

Da alle hier angeführten Eigenschaften auch dem Glykogen zukommen, so wurde untersucht, wie sich die Substanz zu Diastase verhält, die ja bekanntlich Glykogen in Maltose spaltet.

Zu diesem Zwecke wurden 30 ccm einer 10 %igen Lösung dieses Produktes mit 0,6 ccm einer 1 %igen Diastaselösung (Diastase absolut. Merck) 12 Stunden lang bei 58° C digeriert. Nach Verlauf dieser Zeit konnte mit Jodjodkaliumlösung eine Braun-

färbung der Flüssigkeit nicht mehr hervorgerufen werden. Eine davon entnommene Probe reduzierte Fehlingsche Lösung stark. Im Rest der Lösung wurde mit absolutem Alkohol eine Fällung des nicht von Diastase angegriffenen Glykogens erhalten. Die hiervon abgegossene alkoholische Lösung wurde auf dem Wasserbad zu einem vollkommen klaren, süß schmeckenden Sirup eingedampft.

Aus diesem Sirup wurde durch $1^1/_2$ stündiges Erhitzen im Wasserbad mit essigsaurem Phenylhydrazin das Osazon dargestellt. Aus der in der Hitze vollkommen klaren, gelben Lösung fielen erst beim Abkühlen feine, hellgelbe Nädelchen nieder. Diese wurden mehrfach aus heißem Alkohol umkristallisiert und zeigten nach dem Trocknen im Vakuumtrockenschrank bei 100° den Schmelzpunkt von 206° unter Zersetzung. Das erhaltene Osazon war demnach Maltosazon.

Daß die Jodreaktion verschwand und dennoch in der Lösung durch Alkohol fällbares Glykogen vorhanden war, erscheint merkwürdig. Jedoch hat Ch. Philoche[1]) bereits auf diese Erscheinung hingewiesen. Seinen Angaben gemäß erfordert Glykogen in 2%iger Lösung zur vollständigen Verzuckerung viel größere Diastasemengen als Stärkelösung; nämlich 1 g in 50 ccm. Bei geringeren Konzentrationen — weniger als 1 : 100 — soll die Hydrolyse zwar rasch einsetzen, jedoch bereits nach einer Stunde fast zum Stillstand kommen. Das beim Stehenbleiben der Reaktion noch nicht in Maltose umgewandelte Kohlenhydrat soll zwar nicht mehr in Form von Glykogen vorhanden sein, weil sich ja die Lösung mit Jod nicht mehr braun färbt; jedoch soll es sich mit Alkohol fällen lassen.

Es wurde ferner der Versuch gemacht, die hier beschriebene Substanz partiell zu hydrolysieren mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure, analog der Spaltung von Zellulose in Zellobiose. Zu diesem Behuf wurden 6 g der Substanz mit 24 ccm Essigsäureanhydrid, welchem 3 ccm konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt waren, übergossen. Beim Schütteln dieser Mischung trat keine Reaktion ein. Sie begann erst beim Erwärmen auf

[1]) Journ. de chim. physique 6 p. 355—428 1908.

dem Wasserbad. Und zwar verlief sie bei raschem Erhitzen sehr stürmisch, und hierbei trat größtenteils Verkohlung ein. Erhitzte man jedoch vorsichtig, so verlief die Reaktion glatt und ohne zu weitgehende Zersetzung. Das Reaktionsprodukt stellte eine klare hellbraune Lösung dar. Diese wurde in kaltes Wasser gegossen, und hierbei schied sich die Azetylverbindung in groben Brocken vollkommen weiß aus.

Diese Verbindung löste sich ziemlich schwer in heißem Alkohol von 96 % und fiel beim Abkühlen dieser Lösung als feiner amorpher Niederschlag aus. Außerordentlich leicht löste sie sich in Azeton und wurde aus einer solchen Lösung durch Zugabe von Wasser oder Alkohol wieder ausgefällt. Kristallisiert konnte die Verbindung nicht erhalten werden. Aus der Azetonlösung schied sie sich beim langsamen Verdunsten glasig und durchsichtig aus. Die aus heißem Alkohol mehrfach umgelöste Substanz schmolz unter Zersetzung zwischen 165° und 175°. Bei der Verseifung mit Baryt wurde die ursprüngliche Substanz wieder zurückerhalten, wie aus der Jodreaktion hervorging. Eine hydrolytische Spaltung hatte demnach nicht stattgefunden. Ein Glykogentriazetat $C_6H_7O_2\,(C_2H_3O_2)_3$ hat Schützenberger (Bull. Soc. chim. 12 p. 111) als amorphe Masse erhalten, welche bei der Verseifung wieder Glykogen lieferte.

Es erübrigt noch die Beschreibung des bei der Behandlung der gummifreien Membranen im Dampftopf verbleibenden unlöslichen Rückstandes. Nach dem Abgießen der opalisierenden Lösung wurde die kleisterige, braune Masse aufs Filter gebracht und mit kochend heißem Wasser gründlich ausgewaschen. Alsbald lief das Waschwasser vollkommen klar ab, und es konnte mit Jod keine Färbung und mit Alkohol auch nach dem Konzentrieren keine Fällung mehr erhalten werden. Dann wurde mehrfach mit Alkohol nachgewaschen und die Substanz nach dem Trocknen pulverisiert. Sie stellte dann ein hellbraunes, stickstofffreies Pulver dar, welches in Wasser stark aufquoll und sich dann schleimig oder kleisterig anfühlte.

Das Produkt wurde durch 16stündiges Erhitzen mit 8 %iger Schwefelsäure im siedenden Wasserbad hydrolisiert und löste sich hierbei bis auf einen geringen Rest von Huminsubstanzen

vollständig auf. In dem schließlich erhaltenen Sirup wurden Mannose und Dextrose in der gleichen Weise identifiziert, wie sie oben bei der Hydrolyse des Hefengummis angegeben ist. $^2/_5$ des Sirups entfielen auf Mannose und $^3/_5$ auf Dextrose. Bei der Oxydation mit Salpetersäure wurde Schleimsäure nicht erhalten. Auch gab die Substanz keine Furfurolreaktion. Galaktose und Pentosen fehlen demnach, und dieser widerstandsfähigste Teil der Zellwand stellt also ein reines Mannodextran dar.

Es darf wohl angenommen werden, daß die Membranen, die hier zur Untersuchung kamen, wesentliche Veränderungen nicht erlitten hatten; daß sie also die eigentlichen Zellhäute der Hefe darstellten. Ziemlich sicher darf man jedoch vermuten, daß die nach dem Verfahren von Salkowski hergestellten Produkte keine ursprünglichen Bestandteile der Hefenzellwand darstellen, sondern aus dieser erst im Laufe der verschiedenen Eingriffe abgespalten wurden. Dies gilt in erster Linie von dem Hefengummi. Denn da dieses nach seiner Darstellung in Wasser leicht löslich ist, wäre anzunehmen, daß es bei dem zur Herstellung der Membranen erforderlichen monatelangen Auslaugen mit Wasser schon herausgelöst worden wäre, wenn es schon vorher präformiert gewesen wäre. Dies war jedoch nicht der Fall, denn beim Kochen mit Alkali gaben die Membranen eine beträchtliche Menge des Gummikörpers ab.

Was nun den Teil anlangt, den Salkowski als Erythrozellulose bezeichnet, so ist er sicher nichts anderes als Glykogen. Denn abgesehen davon, daß er in seinen Eigenschaften mit dem Glykogen übereinstimmt, spricht auch noch der Umstand für seine Identität mit diesem Kohlenhydrat, daß er aus den Membranen, welche auf die in dieser Arbeit beschriebene Weise durch Autolyse gewonnen waren, nur in minimaler Menge gefunden wurde. Die Erklärung hierfür ist die, daß das Glykogen in der Hefe wahrscheinlich an zwei verschiedenen Plätzen vorkommt. Einmal im Zellinnern, und dann eingelagert und dadurch schwieriger zugänglich in der Zellwand. Und hieraus kann es erst durch Erhitzen mit Wasser unter Druck herausgelöst werden, nachdem durch die Entfernung des Gummis die Membran ohnehin schon verändert ist. Bei der Selbstgärung und Selbstverdauung

nun, welche die Hefe durchgemacht hatte, aus der die Membranen gewonnen worden waren, war auch dieses schwieriger zugängliche Glykogen bis auf diesen äußerst geringen Rest hydrolysiert worden. In der Sedlmayrschen Hefe dagegen, welche durch Alkohol rasch abgetötet worden war, mußte noch alles Glykogen vorhanden sein, was auch durch die relativ große Ausbeute bestätigt wurde.

Als eigentliche Bestandteile der Hefenzellwand würden demnach nur noch zwei Kohlenhydrate übrigbleiben, das Hefengummi und ein Mannodextran. Und diese beiden Teile scheinen nur locker verbunden zu sein, da das Gummi schon durch Kochen mit Wasser herausgelöst werden kann.

Zweiter Teil.

Untersuchungen über das Hefeneiweiß.

Ob am Aufbau der Zellwand der lebenden Hefe auch Eiweißkörper beteiligt sind, läßt sich selbstverständlich aus den vorhergehenden Versuchen nicht ersehen, da bei der Gewinnung des zugrunde liegenden Materials die Eiweißkörper der Hefe vollständig entfernt worden waren. Merkwürdig ist jedenfalls die Tatsache, daß aus frischer, untergäriger Bierpreßhefe durch Behandlung mit verschiedenen Reagentien koagulierbares Eiweiß gewonnen werden kann. In Anbetracht dessen, daß dieses Eiweiß der Hefe verhältnismäßig leicht entzogen wird, und daß Eiweißlösungen durch tierische oder vegetabilische Membranen nicht diffundieren, wurde ursprünglich angenommen, daß es nicht aus dem Zellinhalt stammen könne, sondern der Membran äußerlich anliege und etwa aus der Nährlösung auf die Hefe niedergeschlagenes Eiweiß darstelle. Die bei quantitativen Untersuchungen erhaltenen Eiweißmengen waren jedoch viel zu bedeutend, um eine derartige Auffassung zu stützen. Das gewonnene Eiweiß mußte wenigstens zum größeren Teil aus dem Zellinneren stammen. Allerdings wird man dann, um sich eine solche Eiweißabgabe verständlich zu machen, genötigt, in der

Hefenzellwand verschiedene eiweißdurchlässige Stellen anzunehmen. Von solchen durch Behandlung von frischer Preßhefe mit verschiedenen Agentien erhältlichen Eiweißlösungen handelt der zweite Teil dieser Arbeit.

Nach einem Verfahren von Buchner und Gruber kann man der Hefe koagulierbares Eiweiß entziehen, wenn man sie mit Äther gut durchmischt und dann einige Zeit sich selbst überläßt. Nach kurzer Zeit tritt eine Steigerung der Temperatur, Gasentwicklung und allmähliche Verflüssigung ein. Die breiige Masse wird jetzt mit Wasser aufgenommen. Die nach einigem Stehen abgegossene Flüssigkeit scheidet beim Erhitzen ein flockiges Koagulum aus. Nach diesem Verfahren, welches zur technischen Herstellung von Eiweiß aus Hefe empfohlen wurde, gewann Schröder sein Hefeneiweiß, dessen wichtigste Spaltungsprodukte er quantitativ untersuchte, wie dies schon eingangs erwähnt ist.

Auf eine andere Weise gelangte Sedlmayr zu Hefeneiweiß. Er verrieb Preßhefe mit 10 % festem Ammonkarbonat, nahm nach einigem Stehen mit viel Wasser auf, goß die Flüssigkeit von der Hefe ab und fand durch Hitzekoagulation einen Eiweißkörper mit 15,65 % Stickstoff, den er als Albumin ansprach. Das Schrödersche Hefeneiweiß hatte einen Stickstoffgehalt von 15,78 %.

Im folgenden wurde nun diese Eigentümlichkeit der Hefe, beim Verreiben mit Ammonkarbonat einen Teil ihres Eiweißes abzugeben, näher untersucht. Vor allem sollte festgestellt werden, welche Mengen dieses Salzes am günstigsten wirken, d. h. die größten Mengen Eiweiß liefern. Außerdem galt es zu ermitteln, worauf diese Eiweißabgabe beruht, und die Eiweißlösung selbst näher zu charakterisieren.

Verreibt man, wie Sedlmayr angibt, frische Preßhefe mit festem Ammonkarbonat, so verflüssigt sich die Masse unter Temperaturerniedrigung stark und gerät in lebhafte Selbstgärung. Der anfänglich dünnflüssige Brei nimmt nach deren Beendigung eine zähe Beschaffenheit an. Verrührt man nun diese zähe Masse mit viel Wasser und läßt das Gemenge 24 Stunden stehen, so enthält die ziemlich dunkelbraun gefärbte Flüssigkeit koagulier-

bares Eiweiß in beträchtlicher Menge. Säuert man diese alkalische Lösung so weit an, daß noch keine vollständige Neutralisation eingetreten ist, so fällt das Eiweis flockig aus, und im Filtrat ist kein koagulierbares Eiweiß mehr vorhanden. Die Fällung kann mit Wasser nicht mehr, sondern nur mit Alkalien wieder in Lösung gebracht werden; sie stellt also denaturiertes Eiweiß dar. Auch durch Verreiben mit fester Soda oder mit Ammoniak und Weiterbehandlung in der oben angegebenen Weise konnte aus Hefe Eiweiß gewonnen werden; hierbei verflüssigt sich die Masse ebenfalls, jedoch tritt Selbstgärung nicht ein.

Um nun zu ermitteln, wie sich diese drei Agentien in ihrer Einwirkung auf Hefe zueinander verhalten und unter welchen Bedingungen die größten Eiweißmengen sich aus der Hefe extrahieren ließen, wurden Versuche unter gleichen Bedingungen angestellt.

Die Versuchsanordnung war die folgende. Von der jeweilig angewandten untergärigen Bierpreßhefe wurde eine Trockensubstanzbestimmung und eine Bestimmung des Stickstoffes nach Kjeldahl ausgeführt. Die bei diesen Versuchen zur Verwendung kommende Hefemenge betrug in jedem Fall 20 g. Die obengenannten Agentien wurden jeweils in solcher Menge der Hefe zugesetzt, daß die durch Auffüllen mit Wasser auf genau 250 ccm erhaltene Gesamtflüssigkeit stets normal war in bezug auf das verwendete Reagens.

Mit den für diese Versuchsbedingungen berechneten Mengen der drei Reagenzien wurden die Hefeproben durch gelindes Reiben gut vermischt, eine Stunde stehen gelassen, dann mit Wasser aufgenommen, quantitativ in 250 ccm Meßkölbchen gespült, mit Wasser zur Marke aufgefüllt, gut durchgeschüttelt und 24 Stunden an einem kühlen Ort stehen gelassen. Nach Verlauf dieser Zeit wurden die Lösungen klar filtriert und für jede Probe zwei Parallelversuche mit je 100 ccm der Lösung ausgeführt.

Die durch Behandlung mit Ammoniak bezw. Ammonkarbonat gewonnenen Lösungen wurden koaguliert durch Verkochen des Alkalis und darauffolgende Zugabe einiger Tropfen Essigsäure. Die sodahaltigen Lösungen konnten infolge der alkalischen

Reaktion nicht koaguliert werden. Beim Neutralisieren mit Essigsäure wurde das Eiweiß flockig gefällt. Jedoch wurden auch in diesem Falle die Lösungen samt der Fällung noch eine Stunde im Kochen erhalten.

Die Koagula bezw. das Neutralisationspräzipitat wurden aufs Filter gebracht, mit heißem Wasser gut ausgewaschen, der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt und auf Eiweiß umgerechnet.

Es ergaben sich dabei folgende Resultate:

Durch Behandlung mit Ammoniak wurden extrahiert aus 100 g Hefentrockensubstanz 3,76 g koagulierbares Eiweiß, dessen Stickstoff 7,39 % vom Gesamtstickstoff der Hefe ausmachte.

Durch Behandlung mit Ammonkarbonat wurden aus 100 g Hefentrockensubstanz 3,69 g koagulierbares Eiweiß extrahiert, was 7,38 % des Gesamtstickstoffs der Hefe entsprach.

Durch Behandlung mit Soda wurden erhalten in Form eines Neutralisationspräzipitats aus 100 g Trockensubstanz 4,35 g Eiweiß, was 8,56 % des Gesamtstickstoffs der Hefe entsprach.

Diese drei Reagentien waren also hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Hefe ziemlich gleichwertig.

In der gleichen Weise wurden Versuche mit verschiedenen Ammonkarbonatmengen angesetzt. Zu diesem Zweck wurden zwei Hefeproben mit 10 % bezw. 20 % Ammonkarbonat verrieben. Die Gesamtlösungen enthielten 0,8 % bezw. 1,6 % Ammonkarbonat.

Analog den vorigen Versuchen wurden auch hier das koagulierbare Eiweiß und außerdem im Filtrat der Koagula die extrahierten, nicht koagulierbaren stickstoffhaltigen Substanzen bestimmt.

Im ersten Fall wurden aus 100 g Hefentrockensubstanz 12 g koagulierbares Eiweiß und $3 \times 6{,}25 = 18{,}75$ g nichtkoagulierbare N-haltige Substanzen, berechnet als Eiweiß, gewonnen.

Im zweiten Fall wurden aus 100 g Trockensubstanz 8,25 g koagulierbares Eiweiß und $3{,}1 \times 6{,}25 = 19{,}38$ g nichtkoagulierbare N-haltige Substanzen, berechnet als Eiweiß, gewonnen.

Der Stickstoff des Koagulums machte im ersten Fall 23,4 %, im zweiten Fall 16,1 % des Gesamtstickstoffs der Hefe aus.

Im ganzen waren der Hefe im ersten Fall 65,7 %, im zweiten Fall 52,4 % ihres Gesamtstickstoffs entzogen worden.

Am günstigsten war also die Behandlung mit 10 % festem Ammonkarbonat.

Daß die mit Ammonkarbonat behandelte Hefe nicht gleich nach dem Verrühren mit Wasser, sondern erst nach längerem Stehen ihr Eiweiß abgibt, beweist der folgende Versuch.

Eine Probe frischer Preßhefe wurde mit 10 % festem Ammonkarbonat verrieben und nach 24stündigem Stehen mit Wasser aufgenommen. Nach einer halben Stunde wurde die überstehende Flüssigkeit abgehebert und die Hefe wieder mit der gleichen Menge Wasser angerührt. Diese Operation wurde mehrere Male in Zwischenräumen von je einer halben Stunde vorgenommen. Die so erhaltenen Lösungen lieferten nur minimale Mengen von koagulierbarem Eiweiß. Nachdem die Hefe auf diese Weise ziemlich gründlich gewaschen war, wurde sie mit Wasser zwei Tage an einem kühlen Platze stehen gelassen. Die überstehende klare Flüssigkeit lieferte jetzt verhältnismäßig viel koagulierbares Eiweiß.

Eigenschaften der Eiweißlösungen.

Dialysiert man eine auf die oben angegebene Weise erhaltene Eiweißlösung, so fällt ein grauer, schlammiger Niederschlag aus, der sich in schwach salzhaltigem Wasser wieder löst. Kocht man diese Lösung, so erhält man ein Koagulum. Bei schwachem Ansäuern der Lösung fällt ein flockiger Niederschlag aus. Ausgesalzen wird dieser Eiweißkörper durch Sättigen der Lösung mit Kochsalz oder Magnesiumsulfat. Ebenso durch Halbsättigung mit Ammonsulfat.

Das Filtrat des durch die Dialyse ausgefällten Körpers gibt beim Ansäuern keine Fällung. Beim Sättigen mit Natriumsulfat und Magnesiumsulfat kombiniert erhält man eine milchige Trübung. Ansäuern der kochsalzgesättigten Lösung schlägt das Eiweiß flockig, weiß nieder. Versetzen der neutralen oder schwach alkalischen Lösung mit Ammonsulfat bis zur Sättigung ruft nur eine milchige Trübung hervor. Flockig ausgefällt wird

das Eiweiß hieraus erst beim Ansäuern. Es waren also zwei Eiweißkörper in der Lösung vorhanden.

Zur Ermittelung der Fällungsgrenzen der beiden Eiweißkörper für Ammonsulfat wurde in der folgenden Weise verfahren. Zur Verwendung kamen Lösungen, deren Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt und auf Eiweiß umgerechnet worden war.

Die Lösung der ersten Fraktion enthielt in 100 ccm 3,52 g Eiweiß, die der zweiten 4,25 g Eiweiß. Die Versuchsanordnung war nun so, daß vermittels einer Bürette zu einer bestimmten Menge der Eiweißlösung zunächst so viel destilliertes Wasser zugefügt wurde, als nötig war, um das schließliche Gesamtvolumen auf 10 ccm zu ergänzen, und dann von Probe zu Probe um 0,2 ccm zunehmende Quantitäten einer kaltgesättigten Ammonsulfatlösung. Das spez. Gewicht der Ammonsulfatlösung betrug 1,249. Um dann eine gleichmäßige Verteilung der Mischungen zu erzielen, wurden die Proben gelinde geschüttelt. Die Konzentration, bei der zuerst eine bleibende Trübung eintrat, ergab die untere Fällungsgrenze. Um die obere Fällungsgrenze zu ermitteln, wurde von der Trübung bezw. dem Niederschlag abfiltriert und die Proben mit je 0,2 ccm der gesättigten Ammonsulfatlösung versetzt. Dasjenige Filtrat, welches zuerst vollkommen klar blieb, zeigte die obere Fällungsgrenze an. Dieses Verfahren kam jedoch nur in Betracht für die Lösung der ersten Fraktion, da die zweite erst beim Ansäuern vollständig ausfiel.

Die Fällungsgrenzen der ersten Fraktion lagen demnach zwischen 3,6 und 4,4, die der zweiten Fraktion zwischen 8,2 und 9.

Nach den hier beschriebenen Eigenschaften wäre der erste Körper als ein Globulin, der zweite als ein Albumin anzusprechen.

Der Stickstoffgehalt des Globulins betrug 15,1 %, der des Albumins 16,23 %.

40 % des koagulierbaren Eiweißes entfielen auf das Globulin und 59,99 % auf das Albumin.

Nachdem die Fällungsgrenzen der beiden Eiweißkörper bekannt waren, wurde der Versuch gemacht, zunächst zu dem Albumin allein auf eine einfachere Art zu gelangen, bei der die langwierige Dialyse wegfallen sollte. Es wurde dabei von dem

Gedanken ausgegangen, das Eiweiß durch Verreiben mit Ammonsulfat und Versetzen mit Wasser in Lösung zu bringen. Wenn die Abgabe von Eiweiß lediglich auf der Wasserentziehung und

Lösung der Fraktion I ccm	Wasser ccm	$(NH_4)_2SO_4$-Lösung ccm	Verhalten der Lösung nach Zusatz von $(NH_4)_2SO_4$	Verhalten des Filtrats nach Zusatz von 0,2 ccm	Bemerkungen
5	3	2	klar		
5	2,8	2,2	„		
5	2,6	2,4	„		
5	2,4	2,6	„		
5	2,2	2,8	„		
5	2	3	„		
5	1,8	3,2	„		
5	1,6	3,4	„		
5	1,4	3,6	milchige Trübung	Trübung	untere Fällungsgrenze
5	1,2	3,8	stärkere Trübung	„	
5	1	4	Fällung	„	
5	0,8	4,2	„	„	
5	0,6	4,4	„	klar	obere Fällungsgrenze
5	0,4	4,6	„	„	
5	0,2	4,8	„	„	
5		5	„	„	

Lösung der Fraktion II ccm	Wasser ccm	$(NH_4)_2SO_4$-Lösung ccm	Verhalten der Lösung nach Zusatz von $(NH_4)_2SO_4$	Bemerkungen	
1	1,4	7,6	klar		
1	1,2	7,8	„		
1	1	8	„		
1	0,8	8,2	Trübung		untere Fällungsgrenze
1	0,6	8,4	„		
1	0,4	8,6	„		
1	0,2	8,8	„	Niederschlag beim Ansäuern	
1		9	„	do.	obere Fällungsgrenze

der dadurch bedingten Desorganisation beruhte, mußte dieses Verfahren noch günstiger sein als die vorhergehenden. Nach dem Verreiben sollte mit so viel Wasser aufgefüllt werden, daß

die Lösung mit Ammonsulfat halbgesättigt war, so daß die Albuminlösung allein durch Filtration hätte gewonnen werden können.

Auch bei dieser Behandlung verflüssigte sich die Hefe stark, eine Wasserentziehung fand also jedenfalls statt, geriet jedoch nicht in Gärung. Nach einstündigem Stehen wurde mit so viel Wasser aufgenommen, daß die Flüssigkeit mit Ammonsulfat halbgesättigt war; gleichwohl war in der Flüssigkeit koagulierbares Eiweiß nicht nachweisbar.

Die so behandelte Hefe wurde dann durch sorgfältiges Waschen von dem angewandten Salz und durch Abnutschen von Wasser befreit und in verschiedenen Proben mit Ammonkarbonat, Ammoniak und Soda behandelt. Hierbei verhielt sie sich wie frische Preßhefe. Sie verflüssigte sich, und in den durch Auffüllen mit Wasser erhaltenen Lösungen war koagulierbares Eißweiß vorhanden, welches aus den beiden oben beschriebenen Fraktionen bestand.

Hieraus läßt sich schließen, daß die Hefe nicht infolge der Wasserentziehung durch die angewandten Salze einen Teil ihres Eiweißes abgibt, sondern daß vielmehr die alkalische Reaktion eine solche Abgabe bewirkt. Und wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine Lösung der Eiweißkörper in der alkalischen Flüssigkeit.

Es war ursprünglich beabsichtigt, das Albumin zu hydrolysieren, jedoch mußte von diesem Gedanken Abstand genommen werden wegen der geringen Ausbeute.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Aus den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen über die Zusammensetzung der Hefenmembran geht hervor, daß sie ihrer Natur nach zu den Hemizellulosen zu rechnen ist, und zwar kann man sie als ein Mannodextran bezeichnen. Das aus der Hefe durch Kochen mit Wasser oder Behandlung mit Alkalien erhältliche Gummi darf man wohl nicht als einen besonderen, in der Zellwand der lebenden Hefe präformierten Bestandteil ansehen; man muß eher annehmen, daß es aus dem

größeren Komplex der eigentlichen Hefezellulose durch das Kochen mit Wasser bezw. die Behandlung mit Laugen erst abgespalten wird.

Der Körper, welcher aus einer von Gummi und Eiweiß befreiten Hefe durch Kochen unter Druck nach den Angaben von Salkowski erhalten werden kann, ist kein am Aufbau der Membran beteiligtes Kohlenhydrat, sondern entweder Glykogen selbst oder doch eine dem Glykogen außerordentlich nahestehende Substanz. Zu Diastase verhält sich der Körper ganz wie Glykogen. Auf jeden Fall wird er gleich diesem bei der Selbstgärung und Selbstverdauung der Hefe hydrolysiert und ist deshalb in solchen Membranen, die durch Autodigestion von Hefe gewonnen wurden, nur noch in Spuren vorhanden, während er in frisch abgetöteter, gut ernährter untergäriger Hefe in beträchtlicher Menge vorkommt. Die durch Selbstverdauung von Hefe gewonnenen Membranen machen ca. 19 % der Hefentrockensubstanz aus.

2. Aus frischer Preßhefe kann durch Behandlung mit Ammoniak, Ammonkarbonat oder Soda koagulierbares Eiweiß gewonnen werden, und zwar im günstigsten Fall 12 % der Trockensubstanz. Da der Stickstoff des Koagulums in diesem Fall 23,4 % vom Gesamtstickstoff der Hefe beträgt, so muß man wohl annehmen, daß dieses Eiweiß, wenigstens zum größeren Teil, aus dem plasmatischen Inhalt stammt und vielleicht durch Stellen der Membran, die für Eiweißlösungen durchlässig sind, ausgetreten ist.

Das auf diese Weise gewonnene Eiweiß ist kein einheitlicher Körper, sondern es besteht aus zwei Substanzen, die nach ihren Eigenschaften als Globulin und Albumin anzusprechen sind. Von dem extrahierten Eiweiß entfallen 40 % auf das Globulin und 59,99 % auf das Albumin.

Robert Noske, Borna-Leipzig, Großbetrieb für Dissertationsdruck.